

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

4
B69

This is to certify that the annexed is a true
copy of the following application as filed with this
Office.

DATE OF APPLICATION: March 31, 1988

PATENT APPLICATION NO. 63-80842

APPLICANT: MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL
CO., LTD.

Dated this day of , 198 .

Fumitake YOSHIDA
Director-General
PATENT OFFICE

Certificate No. HEI

APPLICATION FOR PATENT

March 31, 1988

The Director-General
The Patent Office

1. Title of the Invention: BIOSENSOR AND A PROCESS FOR
PREPARATION THEREOF

2. Number of Claims for a Patent: 7

3. Inventors: Name: Mariko KAWAGURI
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
(and three others)

4. Applicant: Name: (582) MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.
Address: 1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
Akio TANII,
Representative Director

5. Agents: Name: (5971) Toshio NAKAO,
Patent Attorney
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
Osaka 571, Japan.
(and another)

Communication Address: Tokyo Detached Office
of the Legal Section
Telephone (Tokyo) 437-1121

6. List of the annexed documents:

(1) Specification	-----	1 copy
(2) Drawings	-----	1 copy
(3) Power of Attorney	-----	1 copy
(4) Duplicate of Application Form	-----	1 copy
(5) Letter for Priority Claim	-----	1 copy

7. Inventors and Agent other than those mentioned above:

(1) Inventors: Name: Mayumi FUJITA
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

Name: Shiro NANKAI
 Address: - do. -

Name: Takashi IIJIMA
 Address: - do. -

(2) Agent: Name: (6152) Shigetaka AWANO,
 Patent Attorney
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

BIOSENSOR AND A PROCESS FOR PREPARATION THEREOF

2. Scope of Claim for a Patent

(1) A biosensor for determining a substrate concentration in a sample solution comprising a base plate having an electrode system comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode, an enzyme layer composed of an oxidoreductase and a hydrophilic high molecular substance being provided on the surface of said electrode system having formed thereon an electron acceptor layer, and a change in concentration of a substance in the reaction among said enzyme, said electron acceptor and said sample solution being electrochemically detected with said electrode system to determine a substrate concentration in said sample solution.

(2) A biosensor for determining a substrate concentration in a sample solution comprising a base plate having an electrode system comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode, an enzyme layer composed of an oxidoreductase and a hydrophilic high molecular substance being provided on the surface of said electrode system having formed thereon an electron acceptor layer containing a surface active agent, and a change in concentration of a substance in the reaction among said enzyme, said

electron acceptor and said sample solution being electrochemically detected with said electrode system to determine a substrate concentration in said sample solution.

(3) A biosensor as claimed in claim 1 or 2, wherein said electrode system is prepared from a material mainly composed of carbon formed on an insulating base plate by means of screen printing.

(4) A biosensor as claimed in claim 1 or 2, wherein said hydrophilic high molecular substance is at least one substance selected from starch type, carboxymethyl cellulose type, gelatin, acrylate type, vinyl alcohol type, vinylpyrrolidone type and maleic acid anhydride type or a mixture of two or more thereof.

(5) A biosensor as claimed in claim 1 or 2, wherein said electron acceptor layer comprises fine particles of an electron acceptor having a particle size of not greater than 100 μm .

(6) A process for preparing a biosensor which comprises forming an electrode system on an insulating base plate, coating a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase on said electrode and then drying to form an enzyme layer, spreading a mixture of an electron acceptor and an organic solvent onto said enzyme layer, and removing said organic solvent to form an electron acceptor layer.

(7) A process for preparing a biosensor which

comprises forming an electrode system on an insulating base plate, coating a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase on said electrode and then drying to form an enzyme layer, next spreading a mixture of an electron acceptor, a surface active agent and an organic solvent onto said enzyme layer, and removing said organic solvent to form an electron acceptor, an electron acceptor layer.

3. Detailed Explanation of the Invention

Field of the Invention

The present invention relates to biosensors which can quantitatively determine a specific component in a trace amount of various sample solutions from the living body in a rapid and easy way with high accuracy and a process for preparation thereof.

Prior Art

As a system for readily performing quantitative determination of a specific component in a sample solution such as blood or the like from living bodies without requiring dilution, stirring, etc. of the sample solution, a biosensor described in Japanese Patent Application Laid-Open No. 61-294351 has been heretofore proposed (Fig. 4). In this biosensor, the electrode systems 2, 3 and 4 composed of carbon, etc. are formed on an insulating base plate 1 by means of screen printing, etc.; the electrode systems are covered with a porous material 9 having carried thereon an oxidoreductase and

an electron acceptor and the whole is integrated with a holding frame 8 and a cover 10. When a sample solution is dropped onto the porous material, the oxidoreductase and the electron acceptor are dissolved in the sample solution, whereby an enzyme reaction proceeds with a substrate in the sample solution and the electron acceptor is reduced. After completion of the reaction, a substrate concentration in the sample is determined from a current level for the oxidation obtained in this case.

Problem to be solved by the Invention

In the foregoing conventional construction, the base surface including the electrode system is not always uniformly wetted so that air bubbles remain between the porous material and the base plate, whereby a response current is affected or its reaction rate is reduced in some occasion. Further when a substance that is readily adsorbed to electrodes is present in a sample solution, response of the sensor is reduced by such a substance.

Means for solving the Problem

In order to solve the foregoing problem, according to the present invention, an electrode system comprised of at least an electrode for measurement and a counter electrode is provided on an insulating base plate, wherein a change of a substance in concentration caused by the reaction among an enzyme, an electron acceptor and a sample solution is electrochemically detected by the electrode system thereby to determine a

substrate concentration in the sample solution; in such a biosensor, an enzyme layer comprised of an oxidoreductase and a hydrophilic high molecular substance is formed on the surface of the electrode system and an electron acceptor layer is provided thereon.

Function

According to the present invention, a disposable type biosensor including the electrode system can be constructed so that a substrate concentration can be determined in an extremely simple way, merely by adding a sample solution. In addition, by forming the enzyme layer and the electron acceptor layer directly on the surface of the electrode system, independent two layers are readily formed in close contact with each other. Thus, miniaturization becomes possible and the reaction can rapidly proceed. Furthermore, the hydrophilic high molecular substance in the enzyme layer can prevent solid components or protein in a sample solution from being adsorbed onto the surface of electrode to improve wettability on the surface of electrode, whereby measurement with good accuracy can be made.

Furthermore, by using the organic solvent for preparing the electron acceptor layer, a thin layer can be rapidly provided and further by adding the surface active agent, the electron acceptor can be efficiently dispersed in the organic solvent to make the preparation

easy, resulting in formation of a stronger layer.

Examples

Hereafter the present invention is described by referring to one embodiment.

(Example 1)

As one embodiment of the biosensor, a glucose sensor is explained. Fig. 1 shows one embodiment of the glucose sensor and is a perspective view of a disassembled glucose sensor. Conductive silver paste is printed on an insulating base plate 1 composed of polyethylene terephthalate by means of screen printing. By drying with heating, the electrode system comprised of a counter electrode 2, an electrode for measurement 3 and a reference electrode 4 is formed. Next, insulating paste is printed in a manner similar to the above so as to partly cover the electrode system to leave the areas 2', 3' and 4' (1mm^2 each) which electrochemically react with the respective electrodes. By a heat treatment, an insulating layer 5 is formed. An aqueous solution of CMC (carboxymethyl cellulose) as one of the cellulosic hydrophilic high molecular substance is coated onto the electrodes to cover the surface of the electrode system (2', 3', 4') followed by drying at 45°C for 30 minutes. A solution of glucose oxidase (GOD) as the oxidoreductase in phosphate buffer solution showing pH of 6.5 is coated thereon and dried at room temperature to form a CMC-GOD layer 6. By this operation, the CMC layer is partly

dissolved, whereby the CMC-GOD layer is formed in such a state wherein CMC is partly mixed with GOD. A mixture of microcrystals of potassium ferricyanide as an electron acceptor and toluene as an organic solvent was dropped thereon. By allowing to stand at room temperature, toluene was evaporated off to form the potassium ferricyanide layer. Even if an aqueous solution of potassium ferricyanide is dropped onto the GOD-CMC layer and dried, the potassium ferricyanide layer is formed. However, it is impossible to dry at high temperatures because GOD is coated so that it takes long time for the drying and crystals of potassium ferricyanide become large. Therefore, the reaction rate becomes slow.

With respect to the particle diameter of microcrystalline potassium ferricyanide used above, commercially available crystals of potassium ferricyanide were ground into powders and crystals of a definite particle diameter were collected by sieving to form a potassium ferricyanide layer. With respect to the sensors prepared from crystals of various particle diameters, their responses were compared with each other. Fig. 3 shows a mesh size of sieve on the abscissa and on the ordinate, a time for completing the reaction to 400 mg/dl of glucose. Numerals with parentheses indicate a size (μm) of the mesh hole. As shown in Fig. 3, crystals having a smaller particle size were dissolved more quickly and the time required for completing the reaction

was shorter. In the sensor prepared with potassium ferricyanide (particle size of 100 μm or less) passed through 145 mesh (Japanese Industrial Standard), the reaction was completed within 2 minutes. In addition, when the potassium ferricyanide layer was prepared, crystals having a smaller particle diameter could form a uniform layer and provided less unevenness in response. Microcrystals of potassium ferricyanide could be formed by grinding into powders but recrystallization of an aqueous potassium ferricyanide solution from ethanol could easily prepare crystals having a particle diameter of not greater than 10 μm . When the potassium ferricyanide layer was formed from such crystals, the layer became dense and the time for completing the reaction could be shortened up to one minute and 30 seconds.

When potassium ferricyanide finely divided into a particle diameter of less than 100 μm was mixed with toluene and the mixture was dropped, toluene was rapidly evaporated and the potassium ferricyanide layer could be formed in a microcrystalline state so that a dissolution rate was rapid and rapid measurement was attained. Although potassium ferricyanide and GOD in a solution state were reacted with each other to render preservation property poor, the potassium ferricyanide layer could be formed by using the organic solvent, whereby the potassium ferricyanide layer was formed without

dissolution of GOD and the reaction with GOD could be prevented. A glucose standard solution, 10 μ l, was dropped as a sample solution onto the glucose sensor constructed as described above. By applying a pulse voltage of +0.6 V to the electrode for measurement in the anode direction 2 minutes after, a response current was measured 5 seconds after. Potassium ferricyanide was dissolved in the glucose standard solution and glucose was oxidized when it reached the CMC-GOD layer. In this case, potassium ferricyanide is reduced to potassium ferrocyanide. By applying the aforesaid pulse voltage, oxidation current in response to the concentration of the formed potassium ferrocyanide is obtained and this current level corresponds to the concentration of glucose which is a substrate. A good linear relationship was obtained up to the concentration as high as 500 mg/dl.

Onto the glucose sensor described above, 10 μ l of blood sample was dropped and a response current was measured 2 minutes after. A response with very good reproducibility was obtained. When pulp having carried thereon potassium ferricyanide was put on the CMC-GOD layer, a response current decreased and a time period of 5 minutes or longer was required for completing the reaction. This is believed to be because blood cells or the like would contaminate to prevent the reaction before potassium ferricyanide was dissolved in the sample solution and reached the CMC-GOD layer. However, by

forming the potassium ferricyanide layer directly on the CMC-GOD layer, the reaction started immediately after the sample solution reached there and completed in 2 minutes. By the presence of the CMC layer, the CMC layer was swollen when the sample solution was dropped thereon so that a current ran smoothly. When GOD was coated directly on the surface of electrode, GOD was adsorbed onto the electrode surface to reduce its response. However, by previously providing the CMC layer, adsorption of GOD could also be prevented. The GOD-CMC layer and the potassium ferricyanide layer could be prepared simply by coating them on the electrode but materials to be carried, filtering membranes, etc. are not required. Such is thus considered to be extremely advantageous in mass production of sensors.

(Example 2)

The CMC-GOD layer was formed as in Example 1. In the case of forming a potassium ferricyanide layer, lecithin (phosphatidyl choline) as a surface active agent was dissolved in toluene to prepare 1 wt% solution and microcrystals of potassium ferricyanide was mixed with the solution. Using the mixture, a layer of potassium ferricyanide and lecithin was formed. Where no lecithin is present, there were noted defects that the potassium ferricyanide layer was non-uniformly formed or the base plate was peeled off when the base plate was bent. However, by incorporating lecithin, the potassium

ferricyanide layer which was uniform and peeled off only with difficulty could readily be formed. As the concentration of lecithin increased, the potassium ferricyanide layer was peeled off more difficultly but a dissolution rate of potassium ferricyanide also decreased. Therefore, a suitable concentration is believed to be 0.01 to 3 wt%. A glucose standard solution was dropped onto the sensor described above and its response was measured in a manner similar to Example 1. Linearity was obtained up to the glucose concentration of 500 mg/dl. Furthermore, when blood was dropped thereon, blood was spread onto the lecithin layer more quickly and the reaction began there. Therefore, response having good reproducibility could be obtained even with a sample in an amount as trace as 6 μ l. Polyethylene glycol alkyl phenyl ether (trademark: Triton X) was used instead of lecithin. In order to disperse fine particles of potassium ferricyanide in toluene, more than 0.1% was necessary but a good potassium ferricyanide layer could be formed as in the case of using lecithin. As the surface active agent, there are oleic acid, polyoxyethylene glycerine fatty acid ester, cyclodextrin, etc., in addition to the example described above. Surface active agents are not particularly limited so long as they can disperse the electron acceptor in an organic solvent and do not affect the enzyme activity.

As the hydrophilic high molecular substance,

gelatin, methyl cellulose and the like can be used, in addition to CMC, and hydrophilic high molecular substances of starch type, carboxymethyl cellulose type, gelatin type, acrylate type, vinyl alcohol type, vinylpyrrolidone type and maleic anhydride type are preferred. These hydrophilic high molecular substances can be readily rendered aqueous solutions. Therefore, by applying the aqueous solution in a suitable concentration and drying, a thin layer having a necessary layer thickness can be formed on the electrode.

As the organic solvent for mixing the electron acceptor therewith, solvents such as toluene, petroleum ether, etc. may be used as long as they have a minimized influence on GOD activity and the printed electrodes.

Screen printing for forming the electrode system is advantageous since a disposable type biosensor having uniform properties can be manufactured at low costs, especially in forming the electrode using carbon which is inexpensive and stable electrode material. In the foregoing examples, the electrode system of three electrodes has been stated. However, measurement can also be made with two electrode systems composed of a counter electrode and an electrode for measurement.

Furthermore, the biosensor of the present invention is not limited to the glucose sensor shown in the foregoing examples but can also be used in the system in which an oxidoreductase takes part, such as an alcohol

sensor, a cholesterol sensor, etc. As the oxidoreductase, glucose oxidase is used in the examples but other enzymes such as alcohol oxidase, cholesterol oxidase, etc. can also be used. Further as the electron acceptor, potassium ferricyanide used in the examples described above is preferred since it stably reacts. The use of p-benzoquinone is suited for more rapid reaction since its reaction rate is large. In addition, 2,6-dichlorophenol indophenol, methylene blue, phenazine methosulfate, β -naphthoquinone, potassium 4-sulfate, ferrocene, etc. can also be used.

Effects of the Invention

As stated above, the biosensor of the present invention can determine a substrate concentration in a vital sample solution in an extremely easy way by pringing the electrode system on an insulating base plate and forming the enzyme layer composed of the oxidoreductase and the hydrophilic high molecular substance and the electron acceptor layer thereon. The hydrophilic high molecular substance can prevent interferants such as protein in the sample solution from being adhered to the electrode surface to improve accuracy in measurement. In addition, the process of the present invention enables to perform rapid reaction and quick measurement since the oxidoreductase and the electron acceptor can be independently carried in close contact. Furthermore, by adding the surface active agent

in forming the electron acceptor layer, a trace amount of the electron acceptor layer can be uniformly carried on a thin layer which is peeled off only with difficulty. Thus, the process is greatly advantageous for preservation property and mass production.

4. Brief Explanation of Drawings

Fig. 1 shows a perspective view of a glucose sensor which is one embodiment of the present invention. Fig. 2 shows a cross-sectional view of the biosensor. Fig. 3 shows a response characteristic of the biosensor. Fig. 4 shows a perspective view of a conventional biosensor.

- 1 base plate
- 2 counter electrode
- 3 electrode for measurement
- 4reference electrode
- 5 insulating layer
- 6 CMC-GOD layer
- 7 potassium ferricyanide layer
- 8 holding frame
- 9 porous material
- 10 cover

Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney,
and another

- (2)
- Insulating base plate*
- 1 --- ~~絶縁性基板~~
- 2 --- ~~対極~~ Counter electrode
- Electrode for measurement* ← 3 --- ~~測定極~~
- 4 --- ~~参照極~~ Reference electrode
- 5 --- ~~絶縁層~~ Insulating layer
- CMC-GDD layer* ← 6 --- ~~CMC-GDD層~~
- 7 --- ~~フェリシアノン化カリウム層~~
Potassium ferricyanide layer
- Fig. 1

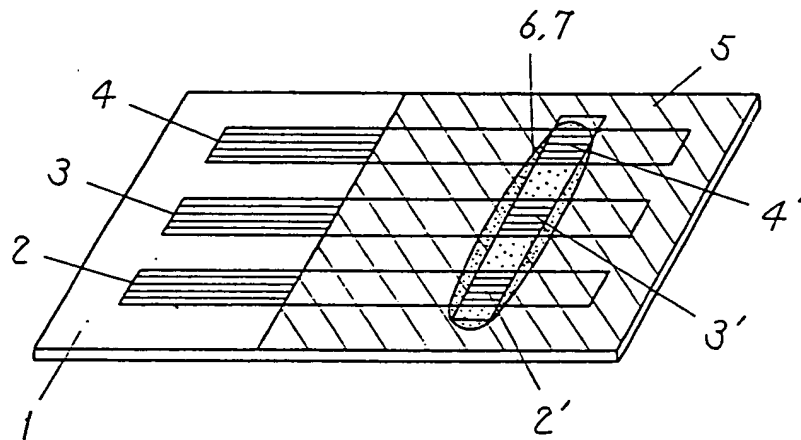
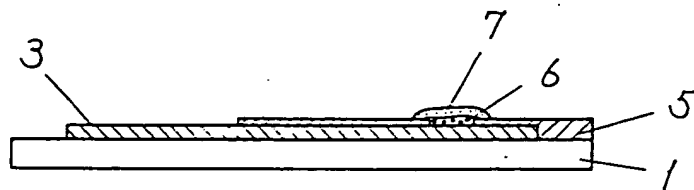


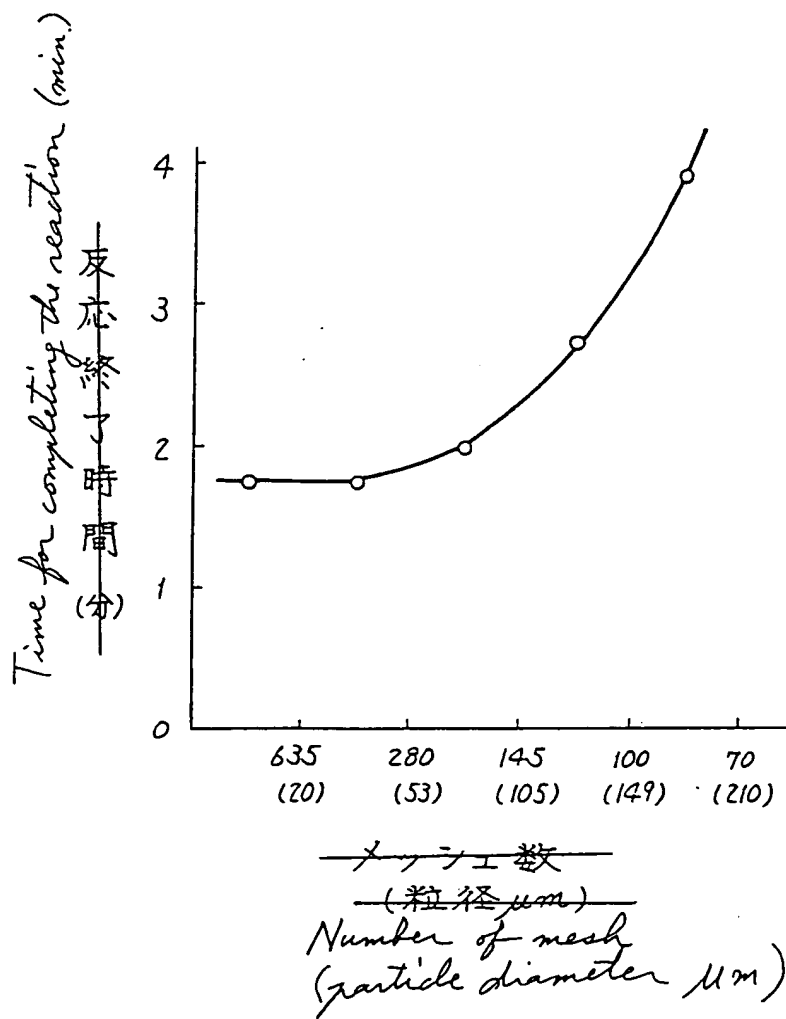
Fig. 2



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

(a) 100

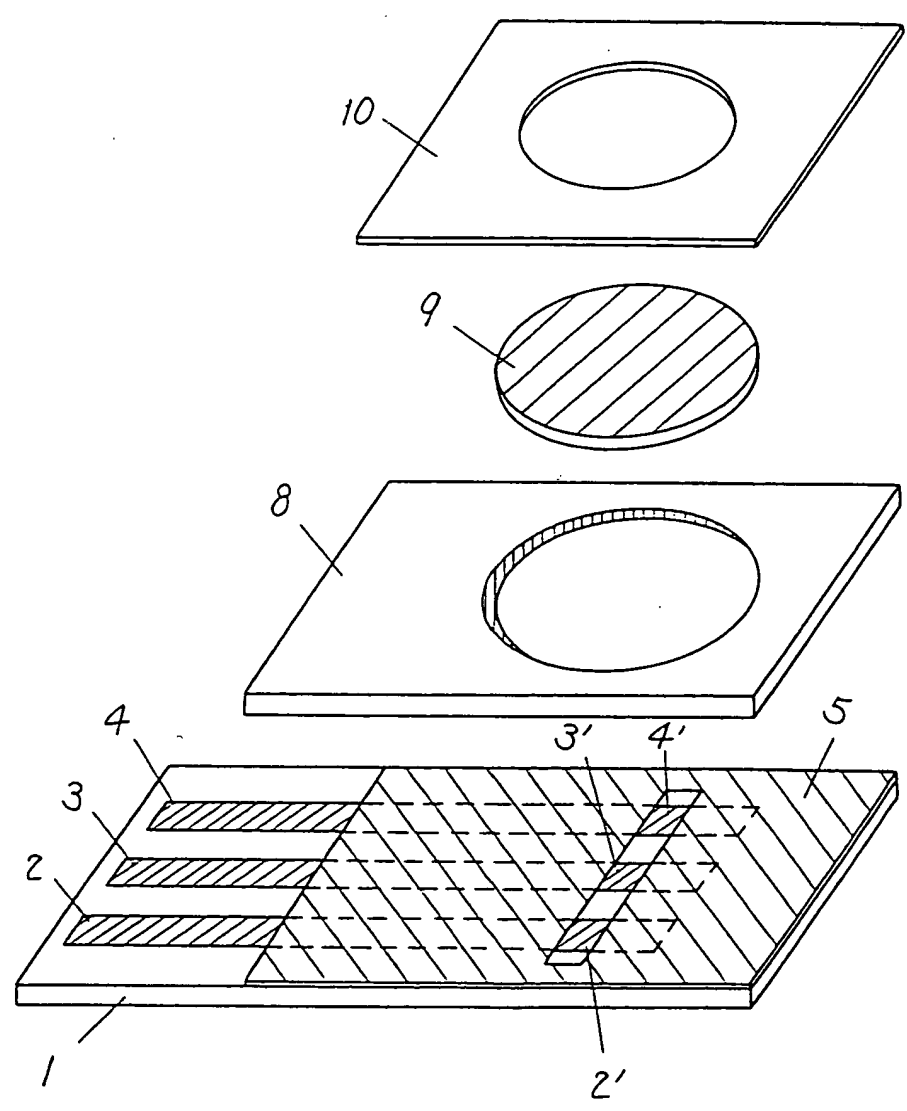
Fig. 3



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

- Insulating base plate ← 1 --- 絶縁性の基板
 Counter electrode ← 2, 2' --- 対極
 Electrode for measurement ← 3, 3' --- 測定極
 Reference electrode ← 4, 4' --- 参照極
 Reference electrode ← 5 --- 絶縁層 Insulating layer
 8 --- 保持枠 Holding frame
 9 --- 多孔体 Porous material
 10 --- カバー Cover

Fig. 4



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-62952

⑮ Int. Cl.⁵
G 01 N 27/327

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)3月2日

7363-2G
7363-2G

G 01 N 27/30

3 5 3 J
R

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全6頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ及びその製造方法

⑰ 特 願 昭63-80842

⑱ 出 願 昭63(1988)3月31日

⑲ 昭63(1988)1月29日 ⑳ 日本(JP) ㉑ 特願 昭63-20946

優先権主張

⑳ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉑ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉒ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉓ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉔ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
㉕ 代 理 人	弁理士 栗野 重孝	外 1 名	

明 細 書

1. 発明の名称

バイオセンサ及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。

(2) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に界面活性剤を含有した電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。

(3) 電極系が、絶縁性の基板上にスクリーン印

刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなる請求項1または2に記載のバイオセンサ。

(4) 親水性高分子が、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系から選択された一つの系の物質もしくは二種以上の系の混合物である請求項1または2に記載のバイオセンサ。

(5) 電子受容体層が、粒径が100 μ m以下の電子受容体の微粒子からなる請求項1または2に記載のバイオセンサ。

(6) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造方法。

(7) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と界面活性

剤と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し、有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサおよびその製造方法に関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量しうる方式として、特開昭 61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した(第4図)。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系2、3、4を形成し、この上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体9で覆い保持枠8とカバー10で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されてい

る酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。発明が解決しようとする課題

この様な従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り応答電流に影響を与え、反応速度が低下した。また、電極に吸着しやすい物質が試料液中にあると、応答が低下した。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するために、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に電子受容体層を形成したものである。

作用

本発明によれば、電極系をも含めたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液をセンサに添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。しかも、電極系の表面に直接、酵素層及び電子受容体層を形成することにより、独立した2層が接近し、反応も迅速に行なわれ、さらに、酵素層の親水性高分子により試料中の固形成分や蛋白質が電極表面に吸着するのを防ぎ、電極表面のぬれ性を向上して精度の良い測定が可能となった。

また、電子受容体層の作製に有機溶媒を用いることにより早く薄い層ができ、さらに、界面活性剤を加えることにより、有機溶媒にうまく電子受容体を分散させ、製造を簡易にし、より強固な層が形成できた。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

(実施例1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサ

その上に有機溶媒としてトルエンに電子受容体であるフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下し、室温で放置してトルエンを気化させることによりフェリシアン化カリウム層を形成した。フェリシアン化カリウムの水溶液をGOD-CMC層に滴下して乾燥してもフェリシアン化カリウムの層は形成される。しかし、GODを塗布しているため、高温の乾燥ができず、乾燥に時間がかかりフェリシアン化カリウムの結晶が大きくなり溶解速度が遅いため反応速度が遅くなった。

上記に用いたフェリシアン化カリウム微結晶の粒径については、市販のフェリシアン化カリウムの結晶を粉砕し、ふるいにより所定の粒径のものを集めてフェリシアン化カリウム層を形成し、各種の粒径のもので作成したセンサについて応答を比較した。第3図は、横軸にふるいのメッシュの大きさ、縦軸にグルコース400mg/dlに対する反応終了時間を示した。()の中は穴の径(μm)を表わしている。第3図に示すように細かい粒径の方が速やかに溶解反応終了に必要な時

間が必要で、GODとの反応が抑制できた。

上記のように構成したグルコースセンサに試料液としてグルコース標準液を10 μl 滴下し、2分後に参照極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.6Vの脉冲電圧を印加し5秒後の電流を測定する。グルコース標準液にフェリシアン化カリウムが溶解し、これがCMC-GOD層に達してグルコースが酸化され、このときフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記の脉冲電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ500mg/dlという高濃度まで良好な直線性が得られた。

上記のグルコースセンサに血液サンプルを10 μl 滴下して2分後の応答電流を測定すると、非常に再現性のよい応答が得られた。フェリシアン化カリウムを担持したバルブをCMC-GOD層の上へ置くと、応答電流が低下し、反応終了まで

間が短かった。145メッシュ(日本工業規格)を通過したフェリシアン化カリウム(粒径100 μm 以下)で作製したセンサは、2分以内に反応が終了した。さらに、フェリシアン化カリウム層を作製するとき粒径が小さい方が均一に膜ができ応答のばらつきが少なかった。フェリシアン化カリウムの微結晶は粉砕でも作製できるが、フェリシアン化カリウムの水溶液をエタノール中で再結晶させると簡単に10 μm 以下の粒径が作成でき、フェリシアン化カリウム層を形成させると密な膜となり、反応終了時間も1分30秒まで短縮できた。

100 μm 以下に微粒化したフェリシアン化カリウムをトルエンに混ぜて滴下すると、トルエンがすみやかに気化し、微粒子のままのフェリシアン化カリウム層が形成でき、溶解速度も速く迅速に測定できた。さらに、溶液状態のフェリシアン化カリウムとGODは反応して保存特性が悪くなる欠点があったが、有機溶媒をもちいることにより、GODが溶解せずに、フェリシアン化カリウムの

に5分以上要した。これは、フェリシアン化カリウムが試料液に溶けてCMC-GOD層に達する前に血球などが混入して反応を防いでいると考えられる。しかし、CMC-GOD層の上に直接フェリシアン化カリウム層を形成することで試料液がくると速やかに反応が始まって2分で終了した。CMC層があることにより、液が滴下されるとCMC層が膨潤し、電流がスムーズに流れた。GODを電極表面に直接塗ると電極表面に吸着され応答が低下するが、予めCMC層を設けることによりGODの吸着も防ぐことができた。GOD-CMC層とフェリシアン化カリウム層は、電極上に単に塗布するだけで作成でき、担持する材料や透過膜などを必要としないためセンサを大量生産する際、非常にメリットがあると考えられる

(実施例2)

実施例1に示したようにしてCMC-GOD層を形成した後、フェリシアン化カリウム層を形成する際トルエンに界面活性剤としてレシチン(ホスファチジルコリン)を溶解して1wt%溶液を

調整し、これにフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを用いてフェリシアン化カリウムとレシチンの層を形成した。レシチンの濃度が0.01wt%以上になるとフェリシアン化カリウムがうまくトルエン中で分散したため滴下が容易となり、3 μ lの微量な液でも薄膜状のフェリシアン化カリウム-レシチン層が形成できた。レシチンがない場合は、フェリシアン化カリウム層が不均一に形成されたり基板をまげるとはがれるという欠点が見られたが、レシチンを添加することにより均一に形成できた。レシチンの濃度が高くなるとともに、フェリシアン化カリウム層のはがれにくくなるが、フェリシアン化カリウムの溶解速度も落ちるため、0.01-3wt%が適当と考えられる。上記センサにグルコース標準液を滴下して実施例1と同様にして応答を測定したところ、グルコース濃度500mg/dlまで直線性が得られた。さらに、血液を滴下したところ、レシチン層によりすみやかにひろがり反応が始まったため、8 μ lという微量

ことができる。

電子受容体を混合する有機溶媒としては、トルエンや石油エーテルなど、GOD活性および印刷電極への影響の少ないものであればよい。

電極系を形成する方法としてのスクリーン印刷は、均一な特性を有するディスプレイタイプは、バイオセンサを安価に製造することができ、特に、価格が安く、しかも安定した電極材料であるカーボンを用いて電極を形成するのは好都合な方法である。上記実施例においては電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定電極からなる2電極方式でも測定は可能である。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として実施例ではグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、等を用いることができる。また、電

のサンプルでも再現性のよい応答が得られた。レシチンのかわりにポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル（商品名：トリトンX）を用いたところ、フェリシアン化カリウムの微粒子をトルエン中に分散させるためには0.1%以上必要であったが、レシチンと同様に良好なフェリシアン化カリウム層が形成できた。界面活性剤としては、前記の例の他に、オレイン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなど、電子受容体を有機溶媒に分散させ、かつ酵素活性に影響をおよぼさないものであれば、特に制限されることはない。

親水性高分子としてCMCの他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、でんぶん系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は容易に水溶液とすることができ、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を電極上に形成する

子受容体として、上記実施例に用いたフェリシアニ化カリウムが安定に反応するので選んでいるがP-ベンゾキノンを使えば、反応速度が大きいので高速化に選んでいる。また、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 β -ナフトキノン4-スルホン酸カリウム、フェロセン等が使用できる

発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層と電子受容体層を形成することにより、極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、試料中のタンパク質などの妨害物質が電極表面に吸着するのを親水性高分子で防ぎ、測定精度を向上させたものである。さらに、本発明の製造方法は、酸化還元酵素と電子受容体を独立させながら担持して近接できるため速やかに反応ができ迅速な測定を可能にした。また、電子受容体層を形成するとき界面活性剤を添

加することにより、微量の電子受容体を均一にか
つはがれにくい薄膜層に担持でき、保存性や大量
生産に大きな効果がある。

4. 図面の簡単な説明

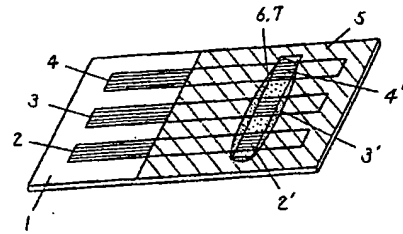
第1図は本発明の一実施例のバイオセンサの斜
視図、第2図は同バイオセンサの縦断面図、第3
図は同バイオセンサの応答特性図、第4図は従来
例のバイオセンサの斜視図である。

1・・・絶縁性基板、2・・・対極、3・・・
測定極、4・・・参照極、5・・・絶縁層、6・
・・・CMC-GOD層、7・・・フェリシアン化カリウム層、8・・・保持枠、9・・・多孔体、
10・・・カバー。

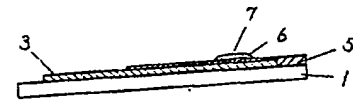
代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか1名

- 1... 絶縁性基板
- 2... 対極
- 3... 測定極
- 4... 参照極
- 5... 絶縁層
- 6... CMC-GOD層
- 7... フェリシアン化カリウム層

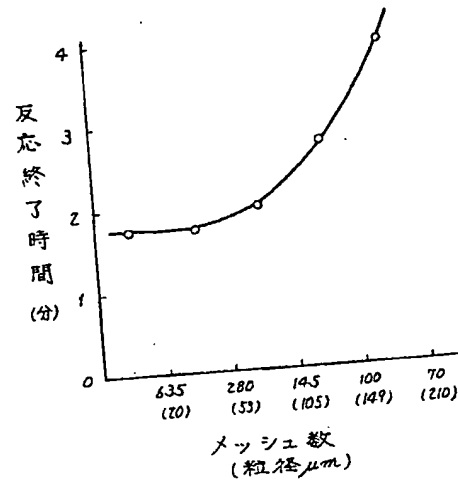
第1図



第2図

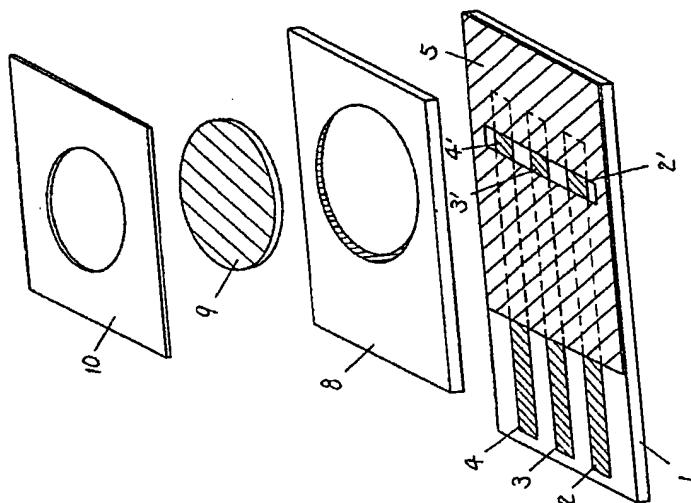


第3図



- 1...絶縁性の基板
 2, 2'...対極
 3, 3'...測定極
 4, 4'...参照極
 5...絶縁層
 8...絶縁保持体
 9...多孔質
 10...カバー

第4図



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成6年(1994)9月16日

【公開番号】特開平2-62952
 【公開日】平成2年(1990)3月2日
 【年通号数】公開特許公報2-630
 【出願番号】特願昭63-80842
 【国際特許分類第5版】

G01N 27/327

【F1】

G01N 27/30 353 J 7235-2J
 R 7235-2J

手続補正書

平成6年3月28日

特許庁長官殿

1 事件の表示
 昭和63年 特 許 願 第 80842号

2 発明の名称
 バイオセンサ及びその製造方法

3 補正をする者
 事件との関係
 住 所
 名 称
 代 理 者
 〒571
 大阪府門真市大字門真1008番地
 (582) 松下電器産業株式会社
 森 下 淳 一
 4 代理人
 住 所
 氏 名
 〒571
 大阪府門真市大字門真1008番地
 松下電器産業株式会社内
 (7242) 弁理士 小 堀 治 明
 (ほか2名)

[連絡先 電話 03-3434-9471 知的財産センター]

5 補正により増加する請求項の数
 0

6 補正の対象
 明細書全文

7 補正の内容
 明細書を別紙の通り全文補正いたします。

明 細 書

1. 発明の名称

バイオセンサ及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検出し前記試料液中の基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。
- (2) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に界面活性剤を含有した電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検出し前記試料液中の基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。
- (3) 電極系が、絶縁性の基板上にスクリーン印刷で形成されたカーボン为主体とする材料からなる請求項1または2に記載のバイオセンサ。
- (4) 親水性高分子が、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、親水マレイン酸系から選択された一つの系の物質もしくは二種以上の系の混合物である請求項1または2に記載のバイオセンサ。
- (5) 電子受容体層が、粒径が100nm以下の電子受容体の微粒からなる請求項1または2に記載のバイオセンサ。
- (6) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と界面活性剤と混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造方法。
- (7) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と界面活性剤と混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体

膜を形成させるバイオセンサの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に測定することのできるバイオセンサおよびその製造方法に関する。

従来の技術

従来の、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡便に測定する方法として、特開昭61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した(第4図)。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系2、活性の基板1上にスクリーン印刷等の方法で電極系を担持した多孔体9で覆われ、3、4を形成し、この上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体9で覆われ、保持層8とカバー10で全体を一体化したものである。試料液を多孔体9上へ滴下すると、多孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り応答電流に影響を与えたり、反応速度が低下した。また、電極に吸着し易い物質が試料液中にあると、応答が低下した。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するために、絶縁性の基板上に少なくとも測定電極と対電極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検出し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素膜を設け、その上部に電子受容体膜を形成したものである。

作用

させることによりフェリシアン化カリウム膜7を形成した。フェリシアン化カリウムの水溶液をGOD-CMC膜に滴下して乾燥してもフェリシアン化カリウムの膜は形成される。しかし、GODを塗布しているため、高温の乾燥ができず、乾燥に時間がかかりフェリシアン化カリウムの結晶が大きくなり溶解速度が遅いため反応速度が遅くなった。

上記に用いたフェリシアン化カリウム微結晶の粒径については、市販のフェリシアン化カリウムの結晶を粉砕し、ふるいにより所定の粒径のものを集めてフェリシアン化カリウム膜を形成し、各組の粒径のものを作製したセンサについて応答を比較した。第3図は、横軸にふるいのメッシュの大きさ、縦軸にグーテングの反応時間を示した。()の中は穴の径(μm)を表わしている。第3図に示すように細かい粒径の方が速やかに溶け、反応終了に必要な時間が短かった。145メッシュ(日本工業規格)を通過したフェリシアン化カリウム(粒径100μm以下)で作製したセンサは、2分以内に反応が終了した。さらに、フェリシアン化カリウム膜を作製するとき粒径が小さい方が均一に膜ができ応答のばらつきが少なかった。フェリシアン化カリウムの微結晶は粉砕でも作製できるが、フェリシアン化カリウムの水溶液をエタノール中で再結晶させると微細な10μm以下の粒径が作製でき、フェリシアン化カリウム膜を形成させると密な膜となり、反応終了時間も1分30秒まで短縮できた。膜の強度、平滑性の点からは10μm以下の粒径の方が好適であった。

100μm以下に微細化したフェリシアン化カリウムをトルエンに混ぜて滴下すると、トルエンがすみやかに気化し、微粒子のままフェリシアン化カリウム膜が形成でき、溶解速度も早く迅速に測定できた。さらに、溶液状態のフェリシアン化カリウムとGODは反応して保存特性が悪くなる欠点があったが、有機溶媒をもちいることにより、GODが溶解せず、フェリシアン化カリウムの膜が形成でき、GODとの反応が抑制できた。上記のように構成したグルコースセンサに試料液としてグルコース標準液を上記のように構成したグルコースセンサに試料液としてグルコース標準液を10μl滴下し、2分後に参照電極を基準にして測定電極にアノード方向+0.6Vの電圧を印加し5秒後の電流を測定する。グルコース標準液にフェリシ

アン化カリウムが溶解し、これがCMC-GOD膜に達してグルコースが還元され、このときフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記の電流値の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づき酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ500μAという高濃度まで良好な直線性が得られた。

また、電子受容体膜の作製に有機溶媒を用いることにより早く薄い膜ができ、さらに、界面活性剤を加えることにより、有機溶媒にうまく電子受容体を分散させ、製造を簡易にし、より強固な膜が形成できた。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

(実施例1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。また第2図は、第1図の測定電極3に付した断面図である。ポリエチレンナフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対電極2、測定電極3、参照電極4からなる電極系を形成する。次に電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'(各1mm²)を残すように、絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱乾燥して絶縁膜5を形成する。この電極系(2'、3'、4')の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるCMC(カルボキシメチルセルロース)の水溶液を塗布し、分子の一種であるCMC(カルボキシメチルセルロース)の上に酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)をpH5.6のリン酸緩衝液に溶解したものを塗布した後、室温で乾燥し、酵素膜であるCMC-GOD膜8を付した。この操作により、CMC膜が一部溶解してGODと混合した状態のCMC-GOD膜が形成された。その上に有機溶媒としてトルエンに電子受容体であるフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下し、室温で放置してトルエンを気化

アン化カリウムが溶解し、これがCMC-GOD膜に達してグルコースが還元され、このときフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記の電流値の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づき酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ500μAという高濃度まで良好な直線性が得られた。

上記のグルコースセンサに血液サンプルを10μl滴下して2分後の応答電流を測定すると、非常に再現性のよい応答が得られた。フェリシアン化カリウムを担持したバルブをCMC-GOD膜の上へ置く、応答電流が低下し、反応が終了するまでに5分以上要した。これは、フェリシアン化カリウムが試料液に溶け、CMC-GOD膜に達する前に血球などが吸着して反応を妨げていると考えられる。しかし、CMC-GOD膜の上に直接フェリシアン化カリウム膜を形成することにより、液が滴下されるとCMC膜が溶解し、電流がスムーズに流れる。GODを電極表面に直接塗布し電極表面に吸着され応答が低下するのを防ぐことができた。GODが、予めCMC膜を設けることによりGODの吸着も防ぐことができた。GOD-CMC膜とフェリシアン化カリウム膜は、電極上に単に塗布するだけで作成でき、担持する材料や通過膜などを必要としないためセンサを大量生産する際、非常にメリットがあると考えられる。

(実施例2)

実施例1に示したようにしてCMC-GOD膜を形成した後、フェリシアン化カリウム膜を形成する際トルエンに界面活性剤としてレシチン(ホスファチジルコリン)を溶解して1wt%溶液を調製し、これにフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを用いてフェリシアン化カリウムとレシチンの膜を形成した。レシチンの濃度が0.01wt%以上になるとフェリシアン化カリウムがトルエン中で分散したため滴下しやすくなり、3μlの微細な液でも得られるという欠点が見られたが、レシチンを加えることにより均一ではがれ

